

Korkean lämpötilan vaikutus hiiren poskihampaan kiilteen kehitykseen *in vitro*

Hanna Inkiläinen, HLK

Opiskelijanumero: 013471309

Helsinki 19.11.2010

Tutkielma

hanna.e.inkilainen@helsinki.fi

Ohjaajat:

Prof. Satu Alaluusua

Dos. Pirjo-Liisa Lukinmaa

FM Carin Sahlberg

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

Hammaslääketieteen laitos, Lasten hammashoito ja hammassairauksien ehkäisy

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

| | | | |
|---|-------------------------------|---|--|
| Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty | | Laitos – Institution – Department | |
| Lääketieteellinen tiedekunta | | Hammaslääketieteen laitos | |
| Tekijä – Författare – Author | | | |
| Hanna Inkiläinen | | | |
| Työn nimi – Arbetets titel – Title | | | |
| Korkean lämpötilan vaikutus hiiren poskihampaan kiilteen kehitykseen <i>in vitro</i> | | | |
| Oppiaine – Läroämne – Subject | | | |
| Hammaslääketiede | | | |
| Työn laji – Arbetets art – Level | Aika – Datum – Month and year | Sivumäärä – Sidoantal - Number of pages | |
| Tieteellinen tutkielma | 11/2010 | 34 | |
| Tiivistelmä – Referat – Abstract | | | |
| <p>Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää kuumetta vastaavan elinviljelylämpötilan vaikutusta hiiren poskihampaiden kiilteen kehittymiseen. Tutkimus tehtiin <i>in vitro</i> ja siinä käytettiin E18-hiiriä, joiden hampaita kasvatettiin 'kuumeessa' (39 °C) kolmannesta kasvatuspäivästä lähtien, osaa viisi ja osaa kolme päivää. Kontrollihampaita kasvatettiin 37 °C:ssa. Hampaita kasvatettiin yhteensä 11 päivää ja lopuksi ne kuvattiin. Stereomikroskooppikuvista mitattiin kiilteen korkeus ja kruunun korkeus ja laskettiin näiden suhde. Hampaat demineralisoitiin, valettiin parafiiniin, leikattiin leikkeiksi ja värjättiin HE-värjäyksellä. Leikkeistä mitattiin kiilteen paksuus ja kiilteen ja dentiinin yhteispaksuus ja laskettiin näiden suhde. Arvoja verrattiin kasvatusryhmien kesken. Tulokset analysoitiin Mann-Whitney-testillä. Kiilteen paksuus suhteessa kiilteen ja dentiinin yhteispaksuuteen oli pienempi 'kuumehampaissa'. Viisi tai kolme päivää 'kuumeessa' kasvatettujen hampaiden välillä ei ollut juurikaan eroja. Kiilteen korkeus suhteessa kruunun korkeuteen oli pienempi 'kuumehampaissa' kuin kontrollihampaissa. Korkea lämpötila ei muutoin näyttänyt vaikuttavan hampaiden kehitykseen. Tutkimuksen perusteella voidaan sanoa, että kasvatuslämpötilan nosto kuumeen tasolle aiheuttaa hiiren molaarihampaan kiilteen kehityksen häiriintymistä. Tulos tukee klinisiä havaintoja, joiden mukaan korkea kuume lapsella voi aiheuttaa kiilteen kehityshäiriöitä.</p> | | | |
| Avainsanat – Nyckelord – Keywords | | | |
| dental enamel, amelogenesis, tooth hypomineralization, body temperature | | | |
| Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited | | | |
| Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information | | | |

SISÄLLYSLUETTELO

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| 2 | Kirjallisuuskatsaus | 2 |
| 2.1 | Hampaan kehitys | 2 |
| 2.2 | Kuume | 12 |
| 2.3 | Kuumeen vaikutus hampaiden kehitykseen | 13 |
| 2.4 | MIH (Molaari-Inkisiivi-Hypomineralisaatio) | 15 |
| 3 | Tutkimusaineisto ja -menetelmät | 18 |
| 4 | Tulokset | 20 |
| 4.1 | Hampaiden kehityksen vaihe päivänä E 18 | 20 |
| 4.2 | Stereomikroskooppiset löydökset | 21 |
| 4.3 | Histologiset löydökset | 24 |
| 5 | Pohdinta | 28 |
| | Lähdeluettelo | 31 |

1 Johdanto

Pienillä lapsilla ovat yleisiä erilaiset infektiot ja tulehdukset, joihin usein liittyy kuume. Kuumeen on todettu edesauttavan sairauden paranemista (Boron ja Boulpaep, 2009). Joissain kokeellisissa tutkimuksissa on kuitenkin esitetty, että kuume itsessään voisi vaikuttaa epäedullisesti hampaiden kehitykseen (Bevelander ja Bernstein, 1940; Garrison, 1940; Tung ym., 2006). Kuumeen ja sen taustalla olevien sairauksien, kuten keuhkokuumeen ja välikorvan tulehduksen, samoin kuin niiden hoitoon käytettyjen tiettyjen antibioottien on epäilty aiheuttavan kiilteen kehityshäiriöitä lapsille (Beentjes ym., 2002; Laisi ym., 2009).

Ihmisellä ensimmäisten pysyvien poskihampaiden kiilteen kehittyminen ajoittuu lapsen ensimmäiseen elinvuoteen. Kiillettä tuottavat ameloblastit ovat herkkiä erilaisille ympäristön aiheuttamille häiriöille. Jos kiillematriksin tuotto häiriintyy, kiille jää normaalia ohuemmaksi, kun taas ongelmat kiilteen kypsymisvaiheessa voivat aiheuttaa kiilteen laadullisia muutoksia, eli hypomineralisaatiota. Ameloblastit ovat herkkiä ympäristön aiheuttamille häiriöille etenkin kiilteen kypsymisvaiheessa, eli silloin kun kiille alkaa kovettua lopullisesti orgaanisen matriksin samalla hajotessa.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli saada selville, millä tavoin korkea lämpötila (39 °C) vaikuttaa 18 päivän ikäisen hiiren sikiön poskihampaan, etenkin sen kiilteen kehittymiseen. Jo kauan sitten on osoitettu kuumeella olevan vaikutusta hammasluun (dentiinin) kehitykseen (Bevelander ja Bernstein, 1940; Garrison, 1940) ja vuonna 2006 havaittiin kuumeella olevan vaikutusta myös rotan etuhampaiden kiilteen kehitykseen (Tung ym., 2006). Mainitussa tutkimuksessa kuume saatiin aikaan tärpätillä. Tutkimuksessa havaittiin, että kiilteessä näkyi radiolusentteja alueita, mikä viittasi kiilteen kehityksen häiriöön, erityisesti hypomineralisaatioon (Tung ym., 2006).

Tässä työssä tutkittiin hiiren poskihampaiden kehitystä *in vitro* (elinviljelmässä). Kuumetta vastaavat olosuhteet saatiin aikaan kasvatuslämpötilaa nostamalla, jolloin tulehdusta ei ole. Mielenkiintoista onkin, mikä merkitys kiilteen kehityksen häiriintymisessä on tulehduksen välittäjäaineilla (sytokiineilla) ja mikä itse lämmön nousulla. Lisäksi, aiemmin on tutkittu kuumeen vaikutuksia etuhampaisiin, kun taas tässä työssä tutkittiin poskihampaita, joiden kehittyminen on tietyillä jysijöillä erilaista kuin etuhampaiden, jotka ovat niillä jatkuvasti uudistuvia hampaita.

Tutkielma alkaa kirjallisuuskatsauksella, jossa käsittelen ensin hampaiden kehittymistä yleensä. Seuraavaksi kerron erityisesti hiirten hampaiden kehittymisestä. Lisäksi kerron kuumeesta ja sen etiologiasta sekä sen vaikutuksista hampaiden kehittymiseen. Lopuksi otan esille vielä MIH:n (Molar-Incisor Hypomineralisation), johon kuumeella on epäilty olevan osuutta.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Hampaan kehitys

Hampaat ovat samaa alkuperää kuin esimerkiksi hiukset, keuhkot ja useat eksokriiniset rauhaset. Niiden kaikkien kehitys perustuu epiteelin ja mesenkyymien välisiin vuorovaikutuksiin, jotka ovat induktiivisia, perättäisiä ja vastavuoroisia. Hammaskille on peräisin pintaektodermistä ja hammasluu ja sementti ektodermin viereisestä mesenkyymistä. Mesenkyymien solut ovat vaeltaneet suun alueelle alkioaikautisesta hermostopienasta. Vaeltavat solut kerääntyvät muodostuvan epiteeliaalisen hammassilmun ympärille ja muodostavat hampaan mesenkyymien (Sariola ym., 2003).

Hampaan kehityksen viestintä lähtee aina liikkeelle suun ektodermistä, joka vaikuttaa alla olevaan mesenkyymiin. Ektodermiin syntyvät signaalikeskukset voivat saada muunkin alueen mesenkyymien noudattamaan hampaan kehityksen linjaa. Ilman suun

ektodermiä hammasmesenkyymi ei siis lähtisi kehittymään hampaaksi (Jernvall ja Thesleff, 2000). Myöhemmin mesenkyymi puolestaan ohjaa ektodermiä erilaistumaan ja kehittymään esimerkiksi kiillettä tuottaviksi ameloblasteiksi.

2.1.1 Signaalimolekyylit

Ihmisen kehittymistä säätelevät erilaiset kasvutekijät, transkriptiotekijät ja muut signaalimolekyylit. Ne ovat peptidejä, jotka sitoutuvat solun pinnan reseptoreihin ja vaikuttavat kohdegeenien luentaan eri toisiohäettien avulla (Thesleff ja Nieminen, 2006). Geenien ilmentymistä (ekspressiota) inhiboidaan ja indusoidaan eri signaalien avulla; signaointi onkin yleensä päällekkäistä (Thesleff, 2003). Samat signaalimolekyylit ovat osallisina eri kudosten ja elinten muodostumisessa (Thesleff ja Nieminen 2006).

Hampaan kehitykselle ovat välttämättömiä viisi eri signaalimolekyyliperhettä: FGF (fibroblastin kaltainen kasvutekijä), BMP (bone morphogenetic protein), Shh (Sonic hedgehog), Wnt (wingless in *Drosophila*) sekä TNF (tumor necrosis factor). Nämä kasvutekijät lähettävät signaaleja hampaan kehityksen eri vaiheissa ja niitä löytyy sekä ektodermistä että mesenkyymistä (Thesleff, 2006; Thesleff ja Nieminen, 2006; Thesleff, 2003). Eritys on parakriinistä, eli signaalit kohdentuvat läheisiin soluihin. Signaalien vaikutuksesta kohdesolujen vapauttavat signaalimolekyylit, tai solujen kyky reagoida seuraaviin signaaleihin, voi muuttua (Thesleff, 2003).

Tärkeitä hampaiden kehittymiselle ovat ns. homeoottisen alueen sisältävien transkriptiotekijöiden ilmentymistä säätelevät homeobox-geenit, jotka määräävät mm. ruumiin kaavoittumisen pää-häntäakselilla. Kaavoittumisessa alkion eri osat saavat omat identiteettinsä ja säätely tapahtuu homeobox-geenien ekpression vaihteluilla (Sariola ym., 2003). Ektodermin signaalien aikaansaama homeobox-geenien erilainen ilmentyminen eri kohdissa hammaskaarta saa aikaan eri hammastyypin

muodostumisen. Hampaan kehitykselle oleellisia transkriptiotekijöitä ovat ektodermistä lähtöisin olevien signaalien kohdemolekyyleinä toimivat *msx*-, *dlx*- ja *lhx*-perheiden transkriptiotekijät (Thesleff, 2006).

2.1.2 Hampaan initiaatio

Hampaan kehityksen anatomia ja histologia on jo pitkään tunnettu yksityiskohtaisesti ja ne on kuvattu useissa oppikirjoissa (esimerkiksi Nanci, 2008). Hampaan kehitys alkaa suun ektodermin paksuuntumisella frontonasaaliulokkeessa ja ylä- sekä alaleuan ulokkeissa, jotka ovat peräisin ensimmäisestä kiduskaaresta (Sariola ym., 2003). Ajatellaan, että hampaan kehityksen alussa ektodermi aloittaa signaloinnin indusoimalla viereistä mesenkyymiä FGF- ja BMP-signaalimolekyyleillä. Näiden vaikutuksesta mesenkyymissä aktivoituvat tietyt transkriptiotekijät, jolloin se jatkaa signalointia takaisinpäin ektodermiin. Tällöin syntyy jokaisen tulevan hampaan kohdalle paksuuntuneeseen hammaslaminaan hammasplakodi, joka toimii ensimmäisenä väliaikaisena signaalikeskuksena (Thesleff, 2003).

2.1.3 Hampaan morfogeneesi

Hampaiden morfogeneesi jaetaan eri vaiheisiin: silmu-, lakki- ja kellovaiheeseen. Kehityksen alkuvaiheessa hammaslaminaan syntyneiden plakodien kohdalle muodostuu riviksi silmuja, joiden ympärille kerääntyy viereisestä mesenkyymistä soluja ektodermin signaalien vaikutuksesta (silmutvaihe) (Jernvall ja Thesleff, 2000; Pispä ja Thesleff, 2003). Silmua edeltäneen hammasplakodin signaalit ohjaavat näitä tapahtumia (Thesleff, 2003). Mesenkyymien solut muodostavat myöhemmin hammaspapillan (tulevan pulpan), jonka perifeerisistä, lähimpänä sisempää kiille-epiteeliä (tulevia ameloblasteja) sijaitsevista soluista erilaistuvat aikanaan odontoblastit. Uloimmaksi hampaan epiteliaalisesta kiille-elimestä jää samoin

mesenkyymistä syntynyt hammasfollikkeli, josta muodostuvat hammasta luuhun kiinnittävä parodontaaliligamentti sekä juuridentiiniä päällystävät sementti ja sementoblastit (Thesleff ja Nieminen, 2006).

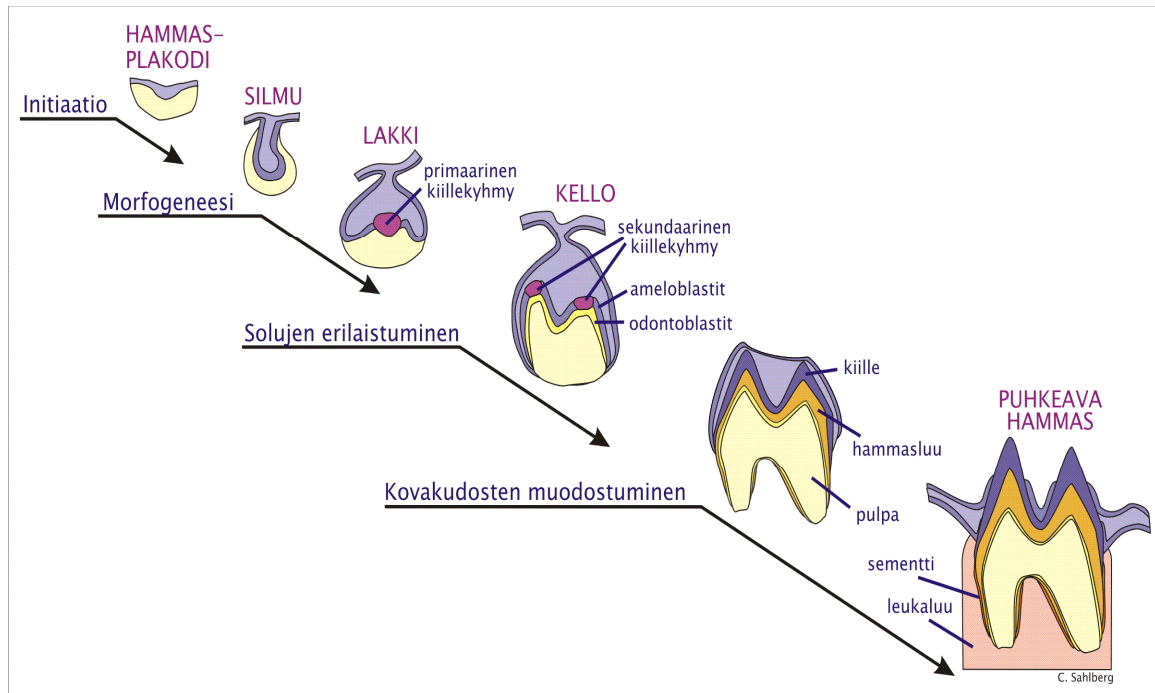
Seuraavassa vaiheessa silmussa alkaa tapahtua poimuttumista, jolloin hampaan kruunun muoto alkaa hahmottua ja kuspit muodostuvat. Laskostuminen tapahtuu mesiaali-distaalisuunnassa. Tätä vaihetta kutsutaan lakkivaiheeksi.

Ektodermistä vapautuvien viestimolekyylien vaikutuksesta hammasmesenkyymi alkaa lähettää signaaleja takaisin ektodermille, jolloin jokaisen tulevan hampaan kohdalle silmun kärkeen alkaa muodostua ns. primaarinen kiillekyhmy. Lakkivaiheen primaarinen kiillekyhmy toimii tietynlaisena signaalikeskuksena. Siitä vapautuu molekyylejä, joilla on tärkeä tehtävä hampaan muodon määräytymisessä ja kehityksen jatkumisessa (Jernvall ja Thesleff, 2000; Pispala ja Thesleff, 2003).

Lakkivaiheessa hammasepiteeli jakautuu ulompaan ja sisempään kiille-epiteeliin, joiden väliin jää stellate reticulum –solukko ja sisempään kiille-epiteeliin rajautuva stratum intermedium -kerros. Tämän yksisoluisen kerroksen solujen solukalvolla on alkaalinen fosfataasi -entsyymiä, joka osallistuu myöhemmin kiilteen mineralisaatioon (Ross and Pawlina, 2006).

Lakkivaihetta seuraavassa kellovaiheessa sekundaariset kiillekyhmyt muodostuvat kunkin syntyvän kuspin kärkeen, jälleen mesenkyymistä tulevien signaalien vaikutuksesta, ja ne säätelevät kusprien muodostumista. Kaikki kiillekyhmyt ovat kuitenkin vain väliaikaisia ja ne kuolevat ohjelmoidun solukuoleman (apoptoosi) seurauksena (Jernvall ja Thesleff, 2000; Thesleff ja Nieminen, 2006). Kellovaiheessa

epiteelin laskostuminen jatkuu ja kuspit saavat muotonsa. Hammassolujen erilaistuminen käynnistyy.



Kuva 1. Hampaan kehityksen yleispiirteet vaiheittain. (Sahlberg, C.)

2.1.4 Hammassolujen erilaistuminen

Ektomesenkymaaliset, hermostopienan mesenkyymistä lähtöisin olevat odontoblastit erilaistuvat hammaspapillan perifeerisistä soluista ja ektodermistä peräisin olevat ameloblastit taas sisemmästä kiille-epiteelistä. Erilaistuminen alkaa kusprien kärjistä ja etenee kervikaalisuuntaan sekä mesio-distaalisesti. Preameloblastit lähettävät signaaleja preodontoblasteille, jotka erilaistuvat odontoblasteiksi kellovaiheen loppupuolella ja tuottavat ohuen kerroksen predentiiniä. Kun predentiini alkaa mineralisoitua dentiiniksi, preameloblastit erilaistuvat kiillettä tuottaviksi ameloblasteiksi. Tämä on hampaan kehitystä säätelevien epiteeli-mesenkyymi-

vuorovaikutusten viimeinen vaihe (Jernvall ja Thesleff, 2000; Tompkins, 2006; Thesleff ja Nieminen, 2006).

2.1.5 Dentiinin muodostuminen ja rakenne

Hammasluu eli dentiini muodostuu odontoblastien tuottamana. Dentiinin, kuten kiilteenkin kehitys alkaa kuspien kärjistä ja etenee kohti hampaan kaulaa (Thesleff ja Nieminen, 2006). Dentiinin muodostuessa siinä voidaan erottaa mineralisoitunut dentiini ja odontoblasteihin rajautuva, viimeksi muodostunut predentiini. Predentiinikerros säilyy mineralisoitumattomana. Predentiiniin rajautuvista odontoblasteista jää dentiiniin kustakin yksi jatke, joka sijaitsee dentiinitubuluksessa. Tubulusta ympäröivää dentiiniä kutsutaan peritubulaariseksi dentiiniksi ja niiden välistä dentiiniä intertubulaariseksi dentiiniksi (Ross ja Pawlina, 2006). Odontoblastit, toisin kuin ameloblastit, pysyvät aktiivisina hampaan koko eliniän.

Dentiini on rakenteeltaan kovempaa kuin luu, sillä se sisältää n. 70 % hydroksiapatiittia (luu 65 %). Dentiinissä ei ole verisuonia eikä soluja kuten luussa. Muodostuttuaan dentiini ei myöskään uusiudu. Dentiinin päärakennekomponentti on tyypin I kollageeni. Lisäksi dentiinissä on lukuisia muita, pääosin mineralisaatioon liittyviä proteiineja. Näitä ovat ns. SIBLING-ryhmän proteiinit, joista tärkein ja määrältään suurin on dentiinin sialofosfoproteiini (DSPP). Käytännössä sitä tavataan vain dentiinissä. Proteiini pilkkoutuu ainakin dentiinin sialoproteiiniksi (DSP) ja dentiinin fosfoproteiiniksi (DPP). Muita dentiinin mineralisaatioon myötävaikuttavia makromolekyyliyhmiä ovat esimerkiksi proteoglykaanit, osteokalsiini ja ns. ei-kudosspesifinen alkaalinen fosfataasi (Ross ja Pawlina, 2006).

2.1.6 Kiilteen muodostuminen ja rakenne

Kiillettä tuottavat ameloblastit erilaistuvat sisemmän kiille-epiteelin soluista mesenkyymien signaalien seurauksena. Mekanismi ei ole täysin selvä, mutta ajatellaan, että sekä odontoblastien signaaleilla että soluväliaineen molekyyleillä on osuutta ameloblastien erilaistumisessa (Thesleff ja Nieminen, 2006). Kuitenkin, jo kauan aikaa on tiedetty, että ameloblastien erilaistuminen ja muuttuminen erittäviksi soluiksi (kiilteen muodostumisen alkaminen) edellyttää, että on muodostunut predentiiniä ja että se on alkanut mineralisoitua (Huggins ym., 1934).

Kiille on elimistömme kovinta kudosta. Kypsästä kiilteestä noin 96 % on mineraalia (hydroksiapatiitti, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ja 4 % orgaanista materiaa ja vettä.

Amelogeneesi jaetaan kolmeen vaiheeseen: sekreetio, jonka aikana tapahtuu ns. primäärinen mineralisaatio, transitio ja maturaatio eli kypsyminen. Sekreetiovaiheessa ameloblastit tuottavat aiemmin muodostuneen dentiinin pinnalle orgaanista matriksia (Thesleff ja Nieminen, 2006). Lähes välittömästi muodostuvat myös hydroksiapatiittikiteet juuri tuotettuun matriksiin. Rinnan mineralisaation kanssa käynnistyy proteiinien pilkkoutuminen. Kiteet ovat aluksi muodoltaan epäsäännöllisiä, eivätkä ne ole vielä järjestäytyneet prismoiksi (sauvoiksi) (Warshawsky, 1971). Sekreetiovaiheen aikana kiilteen paksuus kasvaa ja prismat kasvavat pituutta. Jokaisen ameloblastin erittävällä apikaalipinnalla on ns. Tomesin uloke, jota ympäröi muodostuva kiille (Ross ja Pawlina, 2006).

Transitiovaiheessa, kun kiille on saavuttanut lopullisen paksuutensa, matriksin tuotto hiljalleen pysähtyy ja se alkaa korvautua vedellä. Samalla kiilteen hydroksiapatiittikiteiden kasvu ja proteiinien pilkkoutuminen kiihtyvät (Robinson ym., 1995). Kypsymisvaiheessa kiilteen orgaanisen matriksin proteiinit pilkkoutuvat erilaisten entsyymien avulla, jotta hydroksiapatiittikiteillä olisi tilaa kasvaa ja kiille voisi

mineralisoitua lopullisesti. Tällaisia entsyymejä ovat enamelysiini (matriksin metalloproteinaasi-20; MMP-20) sekä kallikreiini-4 (KLK-4) (Hu ym., 2002; Robinson ym., 1995).

Kypsymisvaiheessa ameloblastien morfologia muuttuu. Ne madaltuvat ja Tomesin ulokkeet katoavat (Robinson ym., 1981a). Lopulta kiilteen mineraalipitoisuus kasvaa aina 96 %:iin. Kypsän kiilteen matriksista on jäljellä ainoastaan pieniä määriä enameliinia ja tufteliinia (Ross ja Pawlina, 2006).

Transitio- ja kypsymisvaiheen aikana suuri osa ameloblasteista kuolee apoptoottisesti (Smith ja Warschawsky, 1977). Myös muita kiille-elimen soluja kuolee (Vaahtokari ym., 1996b). Koska valmis kiille ei ole yhteydessä eläviin soluihin, sitä ei voi muodostua lisää.

Kiille koostuu prismoista, jotka ulottuvat kiilteen pinnalta dentiinin rajalle asti. Ne osoittavat samalla linjan, jota pitkin ameloblasti on kulkenut sekreetiovaiheessa. Prismat ovat poikkileikkausmuodoltaan kuten avaimenreikiä, ja hydroksiapatiittikiteet ovat järjestäytyneet prisman yläosassa rinnakkain, alaosassa vinommin (Ross ja Pawlina, 2006). Kiilteen ´kasvuviivojen´, ns. Retziuksen viivojen, ajatellaan syntyvän ameloblastien Tomesin ulokkeiden jaksottaisen supistumisen seurauksena.

Sekretorisessa vaiheessa yli 90 % muodostuvan kiillematriksin proteiineista koostuu amelogeniineistä. Loput n. 10 % edustavat esimerkiksi ameloblastiineja ja enameliinia. Kaikki kuuluvat ns. erittävään, kalsiumia sitovaan fosfoproteiiniperheeseen ja niillä on omat tehtävänsä ameloblastien toiminnassa ja kiilteen mineralisaatiossa. 1-5 % kiilleproteiineista on enameliineja, jotka ovat kokeellisten tutkimusten mukaan oleellisia kiilteen muodostumiselle (Robinson ym., 1995).

2.1.7 Juuren ja sementin muodostuminen ja sementin rakenne

Kun hampaan kruunu on kehittynyt, hampaan kaulaan muodostuu ns. Hertwigin epiteliaalinen juurituppi. Se muodostuu, kun kiille-elimen ulompi ja sisempi epiteeli yhdistyvät niiden välisen stellate reticulum -kerroksen hävitessä (Thesleff ja Nieminen, 2006; Tummers ja Thesleff, 2003). HERS-solut ohjaavat sementoblastien erilaistumista follikkelisoluista ja tuottavat tyvikalvon proteiineja ja kiilleproteiineja, jotka indusoivat sementoblastien erilaistumista (Thesleff ja Nieminen, 2006). HERS-solut ohjaavat myös odontoblastien erilaistumista, minkä ansiosta dentiini on jatkuvaa kruunun ja juuren välillä. Myöhemmin HERS häviää sementoblastien edeltäjien tullessa alueelle (Tummers ja Thesleff, 2003).

Sementti ympäröi hammasluuta hampaan juuressa ja se muistuttaa luuta, mutta siinä ei ole verisuonia. Sementin mineraalipitoisuus (65 %) vastaa luuta. Kervikaalisesti sijaitseva sementti on solutonta (asellulaarinen sementti) ja apikaalinen sementti on puolestaan solullista (sellulaarista). Sellulaarinen sementti voi paksuuntua vasteena ulkoiselle ärsykkeelle.

2.1.8 Parodontaaliligamentin ja alveoliluun kehitys

Parodontaaliligamentti, joka kiinnittää hampaan alveoliluuhun paksujen kollageenikimppujen välityksellä, kehittyy hammasfollikkelin soluista juuren muodostuessa. Parodontaaliligamentin tehtävänä on lisäksi säädellä luun uudismuodostusta ja resorptiota hampaan ympärillä. Näin tapahtuu esimerkiksi oikomishoidon yhteydessä. Lisäksi follikkelin solut indusoivat alveoliharjanteen luun muodostumista, mutta tarkkaan ei tiedetä, muuttuvatko itse follikkelisolut osteoblasteiksi vai indusoivatko ne viereistä mesenkyymiä (Thesleff ja Nieminen, 2006).

2.1.9 Kehittymisen aikataulu

Hampaiden kehittyminen alkaa ihmisellä sikiövaiheessa siten, että toisen ja kolmannen raskauskuukauden aikana ensimmäiset maitohampaat ovat lakki- ja kellovaiheissa. Seitsemäntenä raskauskuukautena ne siirtyvät myöhäiseen kellovaiheeseen. Jo raskauden aikana pysyvien hampaiden aiheet erkaantuvat lakkivaiheessa olevasta kehittyvästä maitohampaasta. Jokaisen kehittyvän maitohampaan silmusta lähtee toinen, pieni silmu, joka työntyy maitohampaan tyveä kohti muodostaen pysyvän hampaan aiheen maitohampaiden kellovaiheessa. Pysyvät hampaat kehittyvät kellovaiheeseen asti. Kehitys pysähtyy joksikin aikaa, mutta jatkuu, kun hampaan puhkeamisaika lähestyy (Schoenwolf, 2009). Ensimmäisten pysyvien hampaiden kehitys alkaa neljännellä raskauskuulla. Pian syntymän jälkeen nähdään jo mineralisaatiota ensimmäisten molaarien kusprien kärjissä. Ensimmäisen elinvuoden lopulla kiilteen mineralisaatio on voimakasta ensimmäisten molaarien okklusaalipinnoilla jatkuen kohti hampaiden kaulaosia. Toisen pysyvän poskihampaan mineralisaatio alkaa toisena ikävuonna (Logan ym., 1933).

2.1.10 Hiiren hampaiden kehityksen erityispiirteet

Hiirellä on molemmissa leuoissa kaksi etuhammasta ja kuusi poskihammasta, yhteensä 16 hammasta. Etuhampaiden ja poskihampaiden välissä on rako (diasteema). Etuhampaat ovat monilla jyrsijöillä, ihmisistä poiketen, jatkuvasti uusiutuvia hampaita, eli ne kasvavat ja kuluvat koko ajan.

Olennaista jatkuvalle uusiutumiselle on, että hampaan kaulaosaan jää stellate reticulum -soluja, jotka toimivat kantasoluina. Tällöin Hertwigin juurituppea, joka muodostuu stellate reticulum -kerroksen hävitessä, ei synny kruunua tuottavalle alueelle hampaan kaulassa (Tummers ja Thesleff, 2003). Lisäksi, rotan ja hiiren poskihampaiden kusprien kärjissä ei ole kiillettä (Cohn, 1957).

Hiiren poskihampaiden kehittyminen alkaa suun ektodermin paksuuntumisella noin sikiön kehityspäivänä E11. Syntymään (E19) mennessä ensimmäisten poskihampaiden kruunujen morfogeneesi on lähes päättynyt ja odontoblastit ja ameloblastit erilaistuvat kusprien kärjistä alkaen. Tällöin myös hampaan mineralisaatio on alkanut. 11. elinpäivään mennessä ensimmäisten pysyvien poskihampaiden kiilteen kypsymisvaihe on loppuillaan (Cohn, 1957).

2.2 Kuume

Kuume on merkki elimistön tulehdusreaktiosta. Lähes aina se on seurausta infektiosta eli virusten tai bakteerien tunkeutumisesta elimistöön. Kuumeessa hypotalamuksen lämmönsäätelykeskuksen tavoitelämpötila on kasvanut.

Hypotalamuksella on tärkein merkitys kehon lämmönsäätelijänä. Siellä sijaitsevat termoreseptorit reagoivat lämpötilan muutoksiin ja saavat aikaan efferenttien hermoratojen kautta sopivat fysiologiset vasteet kehon tavoitelämpötilan säilyttämiseksi. Lisäksi termoreseptoreita on iholla ja vähemmässä määrin esimerkiksi selkäytimessä ja lihaksissa. Iholta viestitetään hypotalamukselle tietoa ympäristön lämpötilasta. Lämpötilaa muuttaakseen elimistö voi vaikuttaa lämmön poistumiseen tai sen tuottoon ihon verenkiertoa, hikoilua ja luurankolihasen toimintaa muuttamalla (Boron ja Boulpaep, 2009).

Kuumetta aiheuttava tulehduksellinen ärsyke aktivoi elimistön immuunijärjestelmän, jolloin pääasiassa makrofaagit, mutta myös T-lymfosyytit vapauttavat verenkiertoon sytokiineja (Boron ja Boulpaep, 2009). Sytokiinit ovat polypeptidejä, jotka toimivat immuunivasteen säätelijöinä ja voivat toimia endogeenisinä pyrogeeneinä, eli ne

aiheuttavat kuumetta (Ganong, 2005). Kuumeen syntyyn vaikuttavatkin useat eri elimistön sisäiset sytokiinit, joista osa toimii pyrogeeneinä ja osa antipyreetteinä (Kluger ym., 1998).

Pyrogeenit kulkevat verenkierrossa ja vaikuttavat veri-aivoesteen endoteelisoluihin lamina terminaliksen organum vasculosumissa (OVLT), joka sijaitsee kolmannen aivokammion seinämässä. Täällä veri-aivoeste ei ole täydellinen, jolloin sytokiinit pääsevät vaikuttamaan alueelle. Endoteelisoluista vapautuu prostaglandiini E₂:ta (PGE₂), joka diffundoituu vieressä sijaitsevaan hypotalamukseen (Boron ja Boulpaep, 2009). Lämmönsäätelykeskuksen ajatellaan sijaitsevan hypotalamuksen etuosan preoptisella alueella (POA) (Blatteis ym., 1997). Siellä olevat termosensitiiviset neuronit reagoivat PGE₂:een, jolloin ruumiin tavoitelämpötila nousee. Tarkkaa mekanismia ei vielä tunneta. Aluksi lämpötilan nousu on nopeampaa, mutta tavoitelämpötilan lähestyessä se hidastuu (Boron ja Boulpaep, 2009).

In vitro -tutkimuksessa on todettu, että interleukiinien aiheuttama T-lymfosyyttien proliferaatio on paljon voimakkaampaa 39 °C:ssa kuin 37 °C:ssa, mikä antaisi viitteitä siitä, että lievä kuumeilu on hyödyksi (Boron ja Boulpaep, 2009). Kuitenkin, korkea kuume (41 °C) voi aiheuttaa pysyviä aivovaurioita (Ganong, 2005).

2.3 Kuumeen vaikutus hampaiden kehitykseen

Jo kauan sitten korkean lämpötilan on todettu vaikuttavan hampaiden kehittymiseen. Rotilla tehdyissä *in vivo* -tutkimuksissa on selvinnyt, että korkea, keinotekoisesti aiheutettu kuume vaikuttaa dentiinin ja pulpan rakenteeseen.

Tutkimukset on tehty jatkuvasti puhkeavilla inkisiiveillä. Garrison ym. (1940) aiheuttivat rotille 'kuumeen' pitämällä niitä yhteen tai useampaan otteeseen

lämpökaapissa. Kaapin lämpötilaa nostettiin aina 39 °C:een, mutta rotilta mitattu kehon lämpötila vaihteli yksilöittäin. Altistuksen kesto vaihteli välillä 8 ja 72 h (Garrison, 1940).

Toisessa tutkimuksessa ruumiinlämmön kohoaminen saatiin aikaan altistamalla eläimet ruumiinlämmön kohoamiselle joko oskillaattorilla tuotetulla lyhytaaltoisella säteilyllä tai laittamalla ne lämpökaappiin. Lyhyet säteilytysjaksot (10-15 min) jopa kymmenenä päivänä peräkkäin vaikuttivat ainoastaan pulpaan, ja siihenkin ohimenevästi. Pidemmät altistusjaksot (joko säteilytyksellä 1-7 h tai lämpökaappikäsittelyllä 1-10 h) vaikuttivat myös dentiiniin. Altistuslämpötila vaihteli välillä 39,4-42,2 °C (Bevelander ja Bernstein, 1940).

Lyhytaikainen 'kuume' ei vaikuttanut hampaan kovakudosten kehittymiseen, vaan se aiheutti hyperemiaa, eli verisuonten täyttymistä. Hyperemia oli reversiibeliä, eli verisuonet palautuivat pienellä viiveellä ennalleen kuumealtistuksen loputtua (Bevelander ja Bernstein, 1940; Garrison, 1940). Pitkäaikaisemman 'kuumeen' aiheuttamat dentiinin muutokset olivat kuitenkin pysyviä. Niitä olivat dentiinin uloimman osan hypomineralisaatio ja dentiinitubulusten leventyminen sekä dentiinin pulpan puoleisen osan hypermineralisaatio ja tubulusten kaventuminen (Garrison ym., 1940).

Dentiinin muutosalueen paksuus ja epänormaali mineralisoituminen olivat suoraan verrannollisia kuumealtistuksen kestoon ja sen intensiteettiin (Bevelander ja Bernstein, 1940, Garrison ym., 1940). Dentiini oli kuitenkin muuttumatonta niillä alueilla, jotka olivat muodostuneet ennen kuumealtistusta (Bevelander ja Bernstein, 1940). Näissä kokeellisissa tutkimuksissa keinotekoisella kuumeella todettiin olevan vaikutusta lähinnä vain dentiinin eikä niinkään kiilteen kehitykseen (Bevelander ja Bernstein, 1940; Garrison, 1940).

Rotilla tehty *in vivo* -tutkimus, jossa niille aiheutettiin tärpätillä kuume (keskimäärin 1,51 °C korkeampi lämpötila kuin kontrolliryhmässä), sai aikaan inkisiivien kiilteeseen radiolusentin juosteen ja tarkemmin mikroskoopilla katsottuna juosteen alueella kiilleprismat olivat mutkittelevia ja niiden välit olivat suuremmat kuin normaalisti. Lisäksi juosteista löytyi alueita, joissa kiteet olivat epäsäännöllisesti järjestäytyneet tai ne puuttuivat kokonaan (Tung ym., 2006). Kuume kesti tutkimuksessa 52 h ja se saatiin aikaan subkutaanisesti annetulla tärpätillä, joka toimii eksogeenisenä pyrogeeninä (Tung ym., 2006). Tärpähti vaikuttaa makrofaageihin ja monosyytteihin, ja pääasiallisena kuumeen aiheuttajana pidetään interleukiini-1 β :aa (IL-1 β). Tämä sitoutuu IL-1-tyypin reseptoriin, mikä saa aikaan IL-6:n tuoton, joka puolestaan indusoi kuumeen alkamisen (Leon, 2002). Tutkimuksen mukaan ameloblastien toiminta häiriintyi kuumeen aikana, mikä vaikutti todennäköisesti Tomesin ulokkeiden toimintaan, jolloin kiilleprismojen muoto ja paksuus muuttuivat (Tung ym., 2006).

2.4 MIH (Molaari-Inkisiivi-Hypomineralisaatio)

MIH (Molar-Incisor Hypomineralisation) on monitekijäinen kiilteen kehityshäiriö, jossa yhden tai useamman pysyvän poskihampaan, usein myös etuhampaiden, kiille on epätäydellisesti mineralisoitunutta (Weerheijm ym., 2001).

Tiedetään, että kiilteestä voi tulla hypomineralisoitunutta, jos ameloblastien toiminta häiriintyy sen kypsymisvaiheessa. Etenkin aikaisen kypsymisvaiheen ameloblastit ovat erittäin herkkiä ympäristön häiriöille (Suga, 1989). Kiilteestä tulee normaalia pehmeämpää, jolloin myös kariesta aiheuttavat bakteerit pääsevät helpommin sen läpi dentiiniin. Hypomineralisoituneissa MIH-hampaissa nähdään rajautuneita opaakkeja alueita. Vakavasti vaurioitunut kiille murtuu helposti, mikä joskus diagnosoidaan virheellisesti hypoplasiaksi. Kuitenkin MIH-hampaissa voidaan joskus nähdä myös hypoplastista kiillettä. Sekreetiovaiheen häiriöt aiheuttavat normaalia ohuemman kiilteen syntymisen. Hypoplastinen kiille ei silti ole välttämättä hypomineralisoitunutta,

sillä ameloblastit pystyvät vielä toipumaan sekreetiovaiheen aikaisista vauriosta (Suga, 1989).

Dentiinin muutokset ovat MIH-hampaissa vähäisiä; ainoa havaittu muutos on interglobulaarinen dentiini hypomineralisoituneen kiilteen alla. Lisäksi dentiinissä on todettu joitain kemiallisia muutoksia. On mahdollista, että huokoisen kiilteen läpi kulkee happoja dentiiniin, mikä aiheuttaa muutoksia dentiinissä ja pulpassa (Heijs ym., 2007). Ei ole kuitenkaan poissuljettua, etteikö myös odontoblastien toiminta muuttuisi kiilteen hypomineralisaatiossa.

MIH:n syyt ovat edelleenkin epäselvät, mutta on löytynyt monia tekijöitä, joilla saattaa olla vaikutusta kiilteen muodostumiseen ja normaaliin kypsymiseen. Niin kuin Alaluusua (2010) katsausartikkelissaan toteaa, on sekä raskauden- että synnytyksenaikaisilla lääketieteellisillä ongelmilla todettu mahdollisesti olevan vaikutusta MIH:n syntyyn. Osassa tutkimuksista on todettu virtsatieinfektion, toisissa yleensäkin lääketieteellisten ongelmien, yhteys MIH:in (Alaluusua, 2010). Vaikutusta saattaa olla esimerkiksi äidin raskaudenaikaisella diabeteksella ja D-vitamiinin puutteella, samoin synnytyksen pitkittymisellä tai ennenaikaisuudella. Kuitenkin, paljon vastakkaisiakin tuloksia löytyy, joten mitään varmaa ei voida sanoa (Alaluusua, 2010; Crombie, 2009).

Kohtalaista näyttöä on siitä, että lasten altistuminen ympäristömyrkyille (dioksiinit, polyklooratut bifenyylit eli PCB:t) ja alle 1-vuotiaan lapsen saamat amoksisilliinikuurit (Beentjes ym., 2002; Jälevik ym., 2001a; Laisi ym., 2009) voisivat olla yhteydessä MIH:in. Jonkinlaista näyttöä on myös kuumeen (Beentjes ym., 2002) ja lapsuusiän muiden sairauksien, esimerkiksi astman (Jälevik ym., 2001a), keuhkokuumeen (Beentjes ym., 2002; Jälevik ym., 2001a) ja välikorvan tulehduksen (Beentjes ym., 2002) vaikutuksesta MIH:n syntyyn, tosin joitain vastakkaisiakin tuloksia löytyy

katsausartikkeleiden perusteella (Alaluusua, 2010; Crombie ym., 2009). Vielä on osittain epäselvää, onko hypomineralisaation syynä näillä lapsilla itse sairaus, siitä johtuva kuumereaktio vai antibioottihoito.

Toisaalta, juomaveden suuri fluoripitoisuus ei näytä lisäävän MIH:ä, sillä fluori aiheuttaa hampaisiin diffuuseja läpinäkymättömiä alueita poiketen MIH:sta (Alaluusua, 2010).

On hyvin mahdollista, että yksittäiset altisteet eivät saa aikaan hypomineralisaatiota, vaan useat eri tekijät ovat vaikuttamassa MIH:n syntyyn. Kokeellista näyttöä onkin esimerkiksi siitä, että natriumfluoridi ja 2,3,7,8-tetraklooribentso-*para*-dioksiini (TCDD) vahvistavat tässä suhteessa toistensa vaikutusta (Salmela ym., 2009). Asia vaatiikin vielä paljon lisätutkimuksia erilaisilla annoksilla ja erilaiset samanaikaiset altisteet huomioon ottaen (Alaluusua, 2010).

3 Tutkimusaineisto ja -menetelmät

Tutkimukseen käytettiin tiineinä olevia hiiriä (NMRI x NMRI), jotka tainnutettiin CO₂-kammiossa ja niiltä katkaistiin selkäydin sikiöiden kehityspäivänä E18. Hiiristä preparoitiin kohdut ja ne laitettiin jäähän. Kohduista otettiin sikiöt ulos ja niistä preparoitiin stereomikroskoopin alla alaleuat, joista irrotettiin yhdessä ensimmäinen ja toinen poskihammas elinviljelyä varten. Tutkimukseen oli saatu eläinten käyttö lupa (VKL020) Helsingin yliopiston koe-eläinkeskuksesta.

Hampaat jaettiin kolmeen eri ryhmään:

- A. Kontrolliryhmä: Hampaita kasvatettiin 11 päivää 37 °C:ssa.
- B. Hampaita kasvatettiin ensin 3 päivää 37 °C:ssa, sitten 3 päivää 39 °C:ssa ja vielä 5 päivää 37 °C:ssa.
- C. Hampaita kasvatettiin ensin 3 päivää 37 °C:ssa, sitten 5 päivää 39 °C:ssa ja vielä 3 päivää 37 °C:ssa.

Hampaat siirrettiin kasvamaan polykarbonaatista valmistetuille Nucleopore-filttereille (aukon koko 0,1 µm; Corning Inc., New York, USA), joiden alla oli tukena ruostumatonta terästä oleva ristikko. Kasvatus toistettiin kolme kertaa samanlaisena.

Hiilidioksidipitoisuus kaapeissa, joissa kasvatus tehtiin, oli 5 % ja niiden ilma oli kosteutettu. Elatusnesteet vaihdettiin joka toinen tai joka kolmas päivä. Samalla hampaita tutkittiin stereomikroskoopin alla ja katsottiin, että ne kehittyvät normaalisti.

Elatusneste, jossa hampaita pidettiin, sisälsi Dulbecco, vasikan seerumia, askorbiinihappoa ja penisilliiniä. Yhteen kasvatusmaljaan laitettiin 2 ml elatusnestettä, josta 1,8 ml oli pääasiallista elatusainetta Dulbeccon muunnettua Eaglen mediaa, DMEM-glutamax-1:tä (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco BRL, Paisley, Skotlanti), 200 µl 10 %:sta vasikan seerumia (FCS; Gibco BRL), 20 µl askorbiinihappoa (100 µg/ml; Sigma) ja 4 µl penisilliini-streptomysiiniä.

Vasikan seerumissa on erilaisia kasvutekijöistä, joita tarvitaan hampaiden kehittymiseksi. DMEM sisältää puolestaan tarvittavia suoloja ja glukoosia, jolloin saadaan luotua suotuisa ympäristö kehitykselle. Askorbiinihappoa tarvitaan kollageenisynteesiin ja mikrobilääkkeillä estetään haitallisten mikrobien kasvu.

Kasvatus lopetettiin 11 päivän jälkeen, jolloin kaikki hampaat kuvattiin digitaalikameralla stereomikroskoopin alla ja siirrettiin 4 %:een paraformaldehydiin (PFA; Sigma) 4 °C:een 24 tunniksi. Tämän jälkeen hampaita pidettiin EDTA-PFA-liuoksessa (EDTA 0,33 mol/l) 4 °C:ssa 2 viikkoa demineralisaatiota varten. Liuos vaihdettiin kerran viikossa. Eksplantit kuivattiin nousevassa alkoholisarjassa ja käsiteltiin ksyleenissä, jotta parafiini pääsisi tunkeutumaan kudoksiin, ja valettiin sulaan parafiiniin leikkaamista varten.

Blokit leikattiin 7 µm:n paksuisiksi leikkeiksi (Super Frost Plus; Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co., Braunschweig, Saksa), deparafinoitiin ksyleenissä, hydratoitiin laskevassa alkoholisarjassa ja värjättiin HE-värjäyksellä histologista tutkimusta varten. Leikkeet suljettiin Mountexilla (Histolab Products AB, Göteborg, Ruotsi).

Ensimmäisten poskihampaiden stereomikroskooppikuvista mitattiin kiilteen korkeus ja koko kruunun korkeus mesiaalisesta kuspista. Lisäksi leikkeitä tutkittiin valomikroskoopin alla ja jokaisesta ensimmäisestä poskihampaasta mitattiin kiilteen paksuus ja samasta kohtaa kiilteen sekä dentiinin ja predentiinin yhteispaksuus mesiaalisesta kuspista sellaisesta leikkeestä ja leikkeen kohdasta, jossa kiille oli paksuimmillaan ja ameloblastit olivat jo madaltuneet maturaatiovaihetta varten.

Tulokset taulukoitiin ja niistä laskettiin kiilteen korkeuden ja kruunun korkeuden osamäärät. Edelleen laskettiin kiilteen paksuuden sekä kiilteen ja dentiinin (predentiini mukaan lukien) yhteispaksuuden osamäärät. Arvot syötettiin SPSS-tilastointiohjelmaan ja analysoitiin Mann-Whitney-testillä. P-arvo $<0,05$ oli sovittu merkitseväksi tulokseksi.

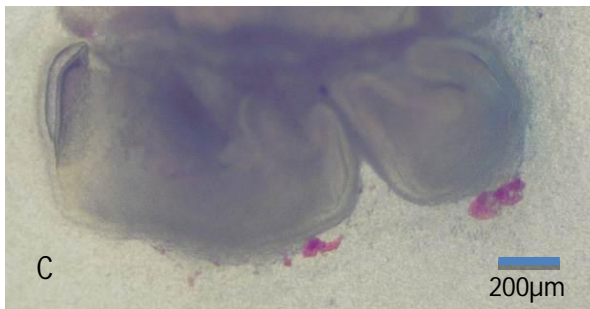
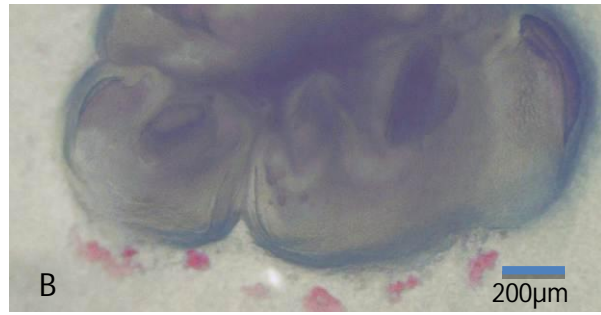
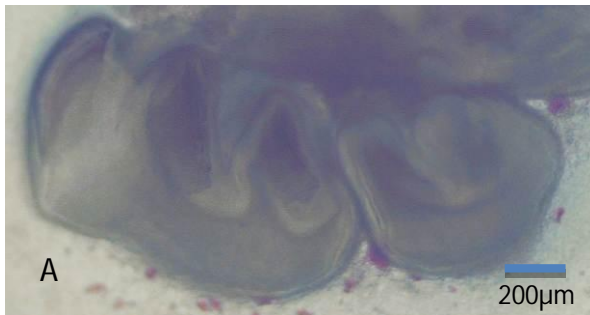
4 Tulokset

4.1 Hampaiden kehityksen vaihe päivänä E 18

Kasvatuksen alkaessa päivänä E18 ensimmäiset poskihampaat ovat myöhäisessä kellovaiheessa. Kuspien morfogeneesi on jotakuinkin päättynyt. Odontoblastien ja ameloblastien erilaistuminen on alkanut ja ne ovat postmitoottisia, eivätkä enää jakaudu. Solut ovat muuttuneet pylväsmäisiksi ja polarisoituneiksi. Predentiinin muodostuminen on alkamassa. Toisten poskihampaiden kehitys on 2-3 päivää jäljessä. Ne ovat siirtymässä lakkivaiheesta kellovaiheeseen.

4.2 Stereomikroskooppiset löydökset

4.2.1 Havainnot kuvista



Kuva 2. Stereomikroskopikuvat hiiren ensimmäisistä alamolaareista 11 päivän kasvatuksen loputtua. A. Kontrollihammas. B. 3 päivää 'kuumeessa' ollut hammas. C. 5 päivää 'kuumeessa' ollut hammas. Kielteen mesiaalisimmassa kuspissa on kehittynyt pisimmälle kohti hampaan kaulaa kontrollihampaassa.

Verrattaessa keskenään kontrollihampaiden ja kolme päivää 'kuumeessa' kasvatettujen hampaiden kehittymistä, ei näkynyt selvää eroa hampaiden koossa tai kielteen määrässä. Viisi päivää 'kuumeessa' olleet hampaat olivat ehkä hieman pienempiä kuin vertailuhampaat, kuten kuvista 2 A ja C näkyy, mutta mitään tarkempaa ei voida sanoa.

4.2.2 Testi- ja kontrollihampaiden kiilteen korkeuden vertailu

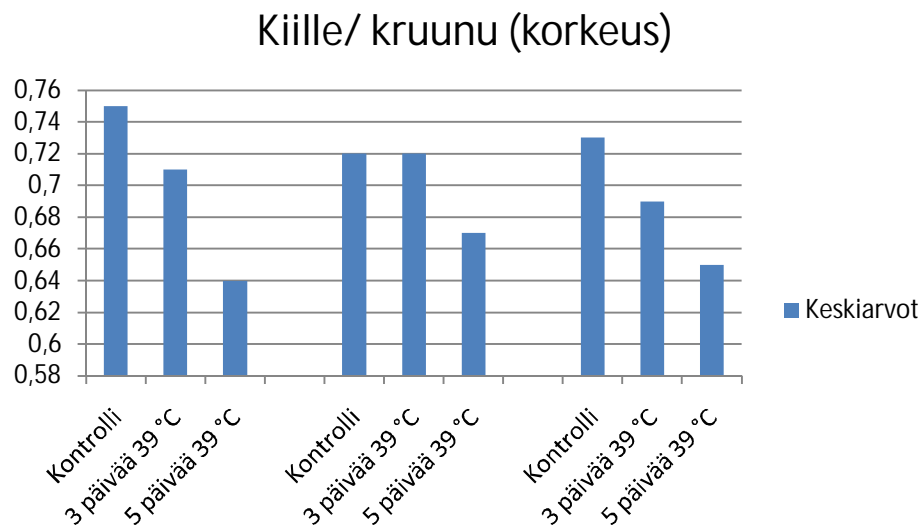
Kiilteen korkeus ja koko kruunun korkeus mitattiin kaikista niistä hampaista, joista mitat oli helposti ja luotettavasti määriteltävissä. Mitat otettiin hampaiden stereomikroskooppikuvista. Mittaustuloksista laskettiin ensin kiilteen ja kruunun korkeuden suhde ja näistä keskiarvot jokaista kasvatusryhmää kohden.

| Altistus | Hampaiden lkm | Osamäärien keskiarvot | Keskihajonta |
|----------------|---------------|-----------------------|--------------|
| Kontrolli | 7 | 0,75 | 0,06 |
| 3 päivää 39 °C | 7 | 0,71 | 0,06 |
| 5 päivää 39 °C | 7 | 0,64 | 0,02 |
| | | | |
| Kontrolli | 7 | 0,72 | 0,07 |
| 3 päivää 39 °C | 7 | 0,72 | 0,05 |
| 5 päivää 39 °C | 8 | 0,67 | 0,06 |
| | | | |
| Kontrolli | 7 | 0,73 | 0,06 |
| 3 päivää 39 °C | 8 | 0,69 | 0,03 |
| 5 päivää 39 °C | 9 | 0,65 | 0,06 |

Taulukko 1. Hiiren ensimmäisen poskihampaan kiilteen korkeus suhteessa kruunun korkeuteen.

Mittaukset stereomikroskooppikuvista 11 päivän kasvatuksen jälkeen.

Taulukossa 1. on esitetty kunkin kasvatusryhmän mitattujen tulosten keskiarvot ja mitattujen hampaiden määrät, sekä keskihajonta kaikista kolmesta kasvatuksesta.



Diagrammi 1. Hiiren ensimmäisen poskihampaan kiilteen korkeus suhteessa kruunun korkeuteen. Mittaukset stereomikroskooppikuvista 11 päivän kasvatuksen jälkeen.

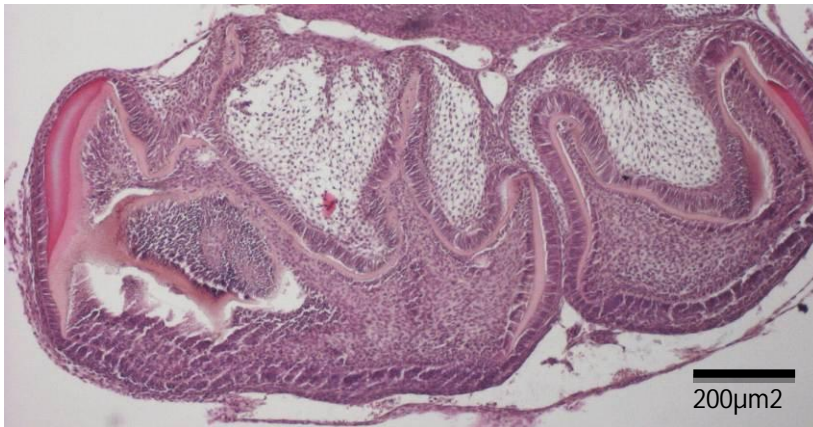
Kiilteen korkeuden suhde kruunun korkeuteen laski lämpötilan noustessa (Diagrammi 1). Mann-Whitney-testin perusteella ei saatu merkitsevää eroa kontrollihampaiden ja kolme päivää 39 °C:ssa pidettyjen hampaiden välille missään kolmesta kasvatuksesta (P-arvot näissä >0,4, >0,8 ja >0,05).

Verrattaessa kontrollihampaita ja viisi päivää 39 °C:ssa pidettyjä hampaita keskenään, saatiin kahdessa kolmesta kasvatuksesta merkitsevä tulos (P-arvo <0,02 ja <0,03), mutta yhdessä kasvatuksessa ero ei ollut merkitsevä (P-arvo > 0,1).

4.3 Histologiset löydökset

4.3.1 Kontrollihampaat

Kasvatuksen loppuessa ensimmäisissä molaareissa mesiaalipinnalla oli juuri alkanut kiilteen kypsymisvaihe kruunun koronaaliosassa, mikä näkyy ameloblasteissa niiden muodon muuttumisena. Solut ovat madaltuneet, kun taas kervikaalisemmat ameloblastit ovat pylväsmäisiä. Toisissa molaareissa oli meneillään kiillematriksin sekreetio. Maturaatio alkaa päivää myöhemmin (Kuva 3).



Kuva 3. Histologinen leike HE-värijäytystä hiiren ensimmäisestä ja toisesta poskihampaasta 11 päivän kasvatuksen jälkeen.

Dentiiniä ja predentiiniä näkyi kiilteen alla (kuva 4).



Kuva 4. Predentiini (P) ja sen vasemmalla puolella odontoblastit (O). D=dentiini. K=kiille. Ameloblastit (A) ovat vielä tässä hampaassa pylväsmäisiä. Tumat ovat sijoittuneet solujen basaaliin. Kuvassa näkyvät myös otetut mitat (kiilteen paksuus ja kiilteen ja dentiinin yhteispaksuus). Kuva on kruunun puolivälin korkeudelta.

4.3.2 Testihampaat

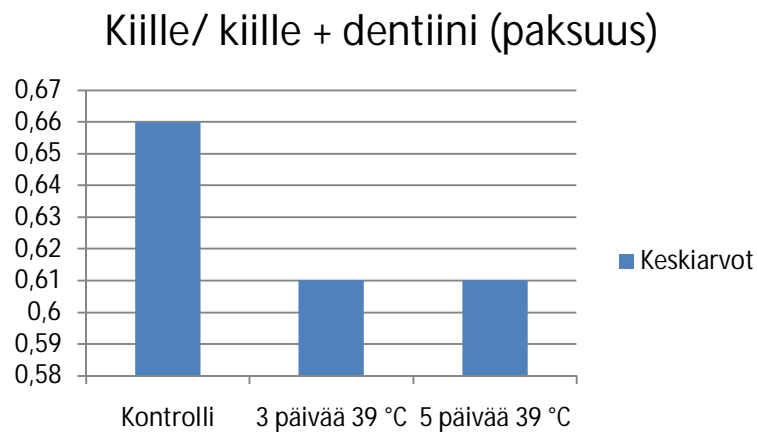
Vertailtaessa kontrollihampaista ja ´kuumehampaista´ tehtyjä leikkeitä keskenään eroja ei juurikaan näkynyt. Kolme päivää ´kuumeessa´ pidettyjen hampaiden kiilteen kehittyminen oli kaikista pisimmällä ameloblastien ollessa pääosin madaltuneita, siis maturaatiovaiheessa. Muissa ryhmissä näkyi hieman enemmän pylväsmäisiä sekreetiovaiheen ameloblasteja. Monissa hampaissa osa ameloblasteista oli vielä selvästi pylväsmäisiä, osa jo madaltuneita.

4.3.4 Testi- ja kontrollihampaiden kiilteen paksuuden vertailu

Jokaisen kasvatusryhmän noin kolmesta hampaasta tehtiin histologiset leikkeet, joista mitattiin kiilteen paksuus sen paksuimmasta kohdasta. Samalta kohtaa mitattiin myös kiilteen sekä dentiinin, predentiini mukaan lukien, yhteispaksuus. Arvoista laskettiin näiden suhde ja tulokset taulukoitiin yhdeksi taulukoksi kaikkien kasvatusten osalta.

| Altistus | Hampaiden lkm | Osamäärien keskiarvot | Keskihajonta |
|----------------|---------------|-----------------------|--------------|
| Kontrolli | 11 | 0,66 | 0,04 |
| 3 päivää 39 °C | 10 | 0,609 | 0,05 |
| 5 päivää 39 °C | 8 | 0,610 | 0,05 |

Taulukko 2. Kiilteen paksuus suhteessa kiilteen ja dentiinin yhteispaksuuteen. Mittaukset tehty hiiren sikiön poskihampaista 11 päivän kasvatuksen jälkeen.

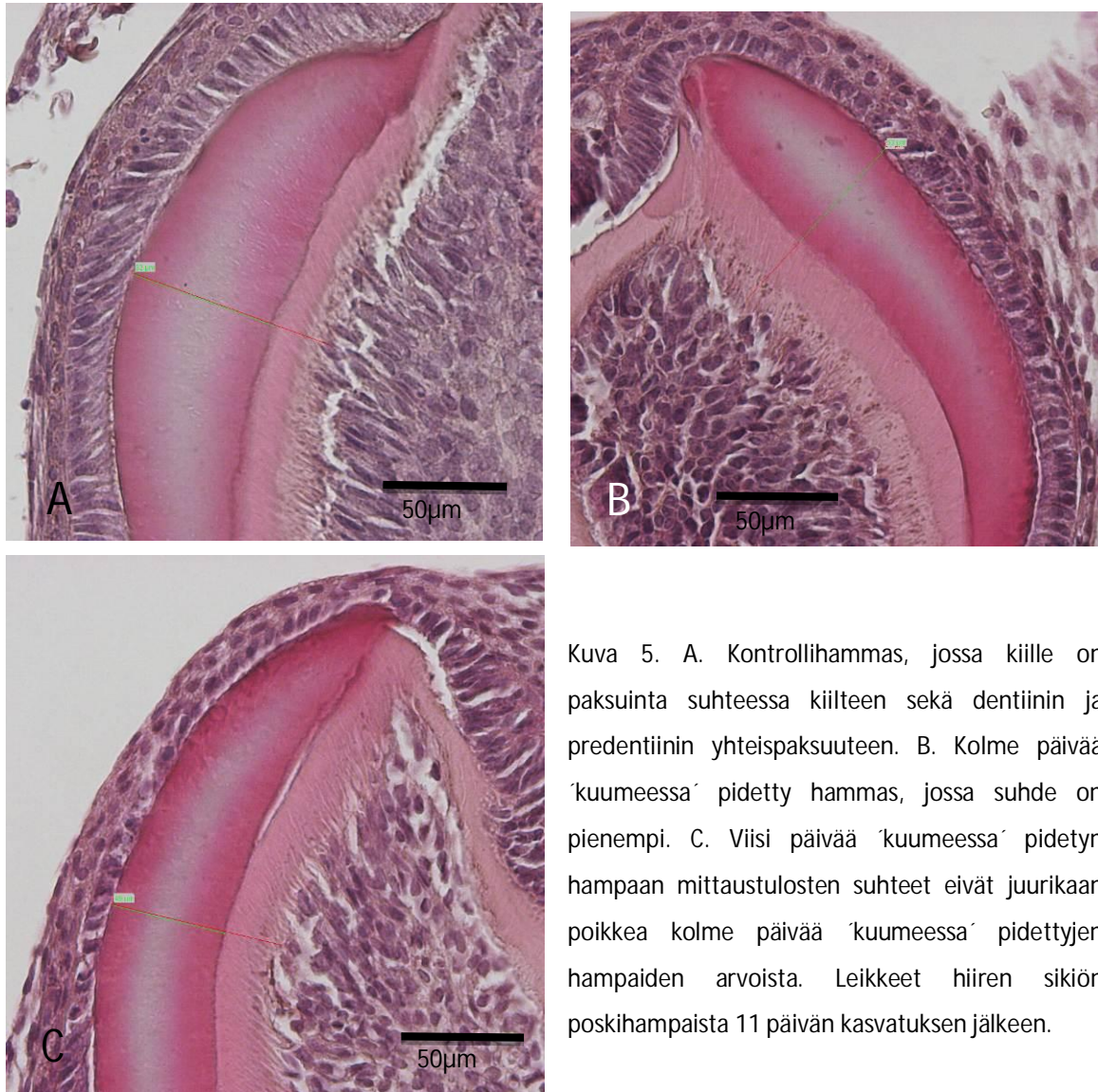


Diagrammi 2. Kiilteen paksuus suhteessa kiilteen ja dentiinin yhteispaksuuteen. Mittaukset tehty hiiren sikiön poskihampaista 11 päivän kasvatuksen jälkeen.

Verrattaessa kontrollihampaita ja kolme päivää 39 °C:ssa pidettyjä hampaita keskenään, saatiin merkitsevä tulos (P-arvo<0,03). Viisi päivää 39 °C:ssa pidettyihin hampaisiin verrattuna ei kontrollihampaisiin nähden puolestaan ollut merkitsevää eroa (P-arvo=0,051). Kuitenkin, verrattaessa kontrollihampaita kaikkiin 'kuumehampaisiin' yhteensä, saatiin merkitsevä tulos (P-arvo<0,01).

Vertasimme myös kiilteen absoluuttisia paksuuksia eri ryhmien välillä. Merkitsevä ero saatiin kolme päivää 'kuumeessa' pidettyjen ja kontrollihampaiden välille (P-arvo<0,02). Viisi päivää 'kuumeessa' pidettyihin hampaisiin verrattuna ei kontrollihampaisiin nähden ollut merkitsevää eroa (P-arvo>0,05). Kun vertasimme kontrollihampaiden kiilteen paksuutta kaikkiin 'kuumehampaisiin', saatiin merkitsevä ero näiden välille (P-arvo<0,01).

Verrattaessa dentiinin absoluuttisia paksuuksia eri ryhmien välillä, ei kuitenkaan saatu merkitsevää eroa. (P-arvot $>0,9$, $>0,8$).



Kuva 5. A. Kontrollihammas, jossa kiille on paksuinta suhteessa kiilteen sekä dentiinin ja predentiinin yhteispaksuuteen. B. Kolme päivää 'kuumeessa' pidetty hammas, jossa suhde on pienempi. C. Viisi päivää 'kuumeessa' pidetyn hampaan mittaustulosten suhteet eivät juurikaan poikkea kolme päivää 'kuumeessa' pidettyjen hampaiden arvoista. Leikkeet hiiren sikiön poskihampaista 11 päivän kasvatuksen jälkeen.

5 Pohdinta

Tässä tutkimuksessa osoitettiin, että *in vivo* -olosuhteissa kuumetta vastaava lämpötila vaikutti epäedullisesti hiiren sikiön poskihampaiden kiilteen kehittymiseen elinviljelmässä. Hampaita pidettiin 11 päivää lämpökaapissa, jonka lämpötila oli joko koko ajan 37 °C tai osan kasvatusajasta 39 °C. On oletettavaa, että hampaissa ei ollut minkäänlaista tulehdusreaktiota, toisin kuin Tungen ja työtovereiden (2006) tutkimuksessa. Niinä päivinä, jolloin hampaita pidettiin 'kuumeessa', niissä oli meneillään kiilteen sekreetiovaihe.

Tungen ja työtovereiden (2006) tutkimuksessa nähtiin kiilteessä radio-opaakkeja alueita, kun taas omassa tutkimuksessamme kiille oli kontrollihampaiden kiilleltä ohuempaa. Tulokset sopivat siihen, että aiempien tutkimusten mukaan ensimmäisissä poskihampaissa tapahtui kiilteen muodostumista juuri niinä kehityspäivinä, joina pidimme hampaita 'kuumeessa' (Cohn, 1957). Tarkkaan ei pystytä kuitenkaan määrittelemään hampaiden kehitysvaiheita tutkimuksen aikana, sillä *in vitro* -tutkimuksissa kehitysaikataulu saattaa poiketa normaalista. Tungen ym. (2006) tutkimuksessa ei ainakaan mainittu kiilteen paksuudessa poikkeavuutta.

Ameloblastit ovat herkkiä ympäristön aiheuttamille häiriöille etenkin amelogeneesin kypsymisvaiheessa (Suga, 1989), mikä antaisi viitteitä siitä, että jo sekreetiovaiheessa ameloblasteihin vaikuttanut ympäristön häiriö (esimerkiksi juuri kuume) voisi jatkuessaan aiheuttaa myös hypomineralisaatiota. Tämä tutkimus ei kuitenkaan vastaa siihen, aiheuttaako kuume nimenomaan hypomineralisaatiota.

Emme kuitenkaan voi tietää, onko 'kuumehampaiden' kehitys jäänyt ainoastaan jälkeen kontrollihampaista, jolloin niiden kiille kehittyisi samaan paksuuteen, mutta

vain myöhemmin. Histologisten leikkeiden perusteella näkyi monista hampaista, että ameloblastit eivät olleet ehtineet maturaatiovaiheeseen asti, sillä ne olivat vielä lähes koko kiilteen korkeudelta pylväsmäisiä ja niissä oli runsaasti sytoplasmaa. Eri ryhmien välillä ei kuitenkaan ollut niin selkeitä eroja, että niistä olisi voinut päätellä 'kuumehampaiden' kehityksen mahdollista jälkeenjääneisyyttä.

Aiemman tutkimuksen (Tung ym., 2006) mukaan ameloblastien toiminta häiriintyi kuumeen aikana, mikä vaikutti todennäköisesti Tomesin ulokkeiden toimintaan, jolloin kiilleprismojen muoto ja paksuus muuttuivat. Tämä taas aiheutti kiilteen hypomineralisaatiota (Tung ym., 2006). Onkin mahdollista, että omassa tutkimuksessamme ameloblastien toiminta muuttui kiilteen kehityksen aikana, mikä sai aikaan kiilteen ohenemisen. Sitä, vaikuttiko kuume Tomesin ulokkeisiin, ei voida päätellä tästä tutkimuksesta.

Vanhemmissa *in vivo* -tutkimuksissa kuumeella ei kuitenkaan osoitettu olevan vaikutusta kiilteen kehitykseen. Näissä tutkimuksissa käytettiin etuhampaita, ja kuumeen kesto oli pisimmillään kolme päivää (Bevelander ja Bernstein, 1940; Garrison ym., 1940). Niissä ei tosin keskitytty kiilteen kehittymiseen, joten muutokset saattoivat jäädä huomaamatta tai ainakaan niitä ei mainittu. Lisäksi, osa kuumejaksoista oli melko lyhyitä, jolloin ameloblastit saattoivat kestää ympäristön rasituksen, eikä niiden toiminta häiriintynyt tai mahdollisesti toiminnan häiriintyminen oli vielä palautuvaa.

Aineistomme oli melko pieni, mikä vaikuttaa siihen, että Mann-Whitney-testillä saadut tulokset vaihtelevat helposti yksittäisestä mittauksesta johtuen. Esimerkiksi verrattessa kontrollihampaiden ja viisi päivää 'kuumeessa' pidettyjen hampaiden kiilteen paksuuden ja kiilteen ja dentiinin yhteispaksuuksien osamääriä keskenään, ei nähty merkitsevää eroa, mikä voi hyvin johtua pienestä otannasta. Koska kasvatus toistettiin

kolme kertaa, voidaan kuitenkin olettaa, että altistettujen hampaiden kiilteen huonompi kehittyminen ei johtunut satunnaisvaihtelusta.

Nähtävissä oli kuitenkin, että kiilteen korkeus suhteessa kruunun korkeuteen on selvästi pienempi viisi päivää 'kuumeessa' pidetyillä hampailla, mutta ei kolme päivää 'kuumeessa' pidetyillä hampailla. Pitkäkestoisemmalla kuumeella näyttää siis olevan selvä vaikutus siihen, kuinka hyvin kiille kehittyy.

Mielenkiintoista mittaustuloksissa on, että kiilteen paksuus suhteessa kiilteen ja dentiinin yhteispaksuuteen ei olennaisesti muuttunut sen mukaan, oliko hampaita pidetty 'kuumeessa' viisi vai kolme päivää. Olisikin mielenkiintoista tietää, onko ensimmäisessä molaarissa kiilteen sekreetio päättynyt kasvatuksen kuudenteen päivään mennessä, jolloin kolme päivää 'kuumeessa' olleet siirrettiin takaisin normaalilämpötilaan. Tämä selittäisi sen, että 'kuumehampaiden' mittaustulokset eivät juurikaan poikenneet toisistaan.

Tässä tutkimuksessa osoitettiin, että korkea lämpötila aiheutti hiirten kehittyvien poskihampaiden kiilteen ohenemista. Häiriö ameloblastien toiminnassa voi olla myös ohimenevä, jolloin 'kuumehampaat' kehittyisivät myöhemmässä aikataulussa normaalisti.

Suoranaisia kliinisiä johtopäätöksiä ei kuitenkaan voida tehdä. Tutkimus tehtiin hiirillä, ja vaikka poskihampaiden kehitys ihmisillä ja hiirillä on melko samanlaista, ei tuloksia voida varmuudella rinnastaa ihmisiin. Lisäksi, tutkimus tehtiin *in vitro* -olosuhteissa, joten hampaiden kehittyminen ei ollut luonnollista. Tungin ym. (2006) mukaan kuume saattaa olla vaikuttamassa MIH:n syntyyn. Tulostemme perusteella kiilteen tuottaminen mahdollisesti häiriintyy kuumeessa, mutta suoraa yhteyttä MIH:iin ei voida osoittaa. On kuitenkin mahdollista, että lapsuusiän kuume on yksi MIH:n riskitekijöistä.

Lähdeluettelo

Alaluusua, S. Aetiology of Molar-Incisor Hypomineralisation: A systematic review. *Eur J Paediatr Dent* 2010;11:53-58.

Beentjes, V.E., Weerheijm, K.L. & Groen, H.J. Factors involved in the aetiology of Molar-Incisor Hypomineralisation (MIH). *Eur J Paediatr Dent* 2002;1:9-13.

Bevelander, G., Bernstein J.G. The Effect of Artificially Induced Fever On the Structure of the Developing Teeth of the Rat. *J Dent Res* 1940;19:155-163.

Blatteis, C.M. & Sehic Elmir. Fever: How may circulating pyrogens signal the brain?. *News Physiol Sci* 1997;12:1-8.

Boron, W.F. & Boulpaep, E.L. *Medical Physiology*. 2009 2. painos, Saunders Elsevier.

Cohn, S.A. Development of the molar teeth in the albino mouse. *Am J Anat* 1957;101:295-320.

Crombie, F., Manton, D. & Kilpatrick, N. Aetiology of molar-incisor hypomineralization: a critical review. *Int J Paediatr Dent* 2009;19:73-83.

Farah RA. ym. Protein content of molar-incisor hypomineralisation enamel. *J dent* 2010;38(7):591-6.

Ganong, W.F. *Review of Medical Physiology*. 2005 22. painos, Mc Graw Hill.

Garrison LH. The effect of fever on the development of the rat incisor. *J Dent Res* 1940;19:215-225.

Heijs, S.C., Dietz, W., Noren, J.G., Blanksma, N.G. & Jalevik, B. Morphology and chemical composition of dentin in permanent first molars with the diagnose MIH. *Swed Dent J* 2007;31:155-164.

- Hu, J.C., Sun, X., Zhang, C., Liu, S., Bartlett, J.D., Simmer, J.P. Enamelysin and kallikrein-4 mRNA expression in developing mouse molars. *Eur J Oral Sci* 2002;110:307-315
- Huggins, C.B., McCarroll, H.R. & Dahlberg, A.A. Transplantation of tooth germ elements and the experimental heterotopic formation of dentin and enamel. *J Exp Med* 1934;60:199-210.
- Jälevik, B., Nören, J.G., Klingberg, G. & Barregård, L. Etiologic factors influencing the prevalence of demarcated opacities in permanent first molars in a group of Swedish children. *Eur J Oral Sci* 2001a;109:230-234.
- Jernvall, J. & Thesleff, I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 2000;92:19-29.
- Kluger, M.J., Kozak, W., Leon, L.R. & Conn, C.A. The use of knockout mice to understand the role of cytokines in fever. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998;25:141-144.
- Laisi, S., Ess, A., Sahlberg, C., Arvio, P., Lukinmaa, P. & Alaluusua, S. Amoxicillin May Cause Molar Incisor Hypomineralisation. *J Dent Res* 2009;88:132-136.
- Leon, L.R. Cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. *J Appl Physiol* 2002;92:2648-2655.
- Logan W.H.G. & Kronfeld R. Development of human jaws. *Am J Dent Assoc* 1933;20:379-427.
- Nanci A. toim. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. 2008 7. painos, Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Pispa, J. & Thesleff, I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol* 2003;262:195-205.

Robinson, C., Briggs, H.D. & Atkinson, P.J. Histology of enamel organ and chemical composition of adjacent enamel in rat incisors. *Calcif Tissue Int* 1981a;33:513-520.

Robinson, C., Kirkham, J., Brookes, S.J., Bonass, W.A. & Shore, R.C. The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol* 1995;39:145-152.

Ross, M.H. & Pawlina, W. *Histology: a text and atlas*. 2006 5. painos, Lippincott Williams & Wilkins.

Sahlberg, C., kuva: Hampaan kehityksen yleispiirteet

Salmela, E., Partanen, A., Sahlberg, C., Lukinmaa, P. & Alaluusua, S. Combined effect of TCDD and fluoride on dental hard tissue formation in vitro. *Int J Paediatr Dent* 2009;19:83-84.

Sariola H. ym. *Solusta yksilöksi Kehitysbiologia*. 2003 1. painos, Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä.

Schoenwolf, G.C. ym. *Larsen's Human embryology*. 2009 4. painos, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia.

Smith, C.E., Warshawsky, H.: Quantitative analysis of cell turnover in the enamel organ of the rat incisor. Evidence for ameloblast death immediately after enamel matrix secretion. *Anat Rec* 1977;187:63-98

Suga, S. Enamel hypomineralization viewed from the pattern of progressive mineralization of human and monkey developing enamel. *ADR* 1989;3:188-198.

Thesleff, I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 2003;116:1647-1648.

Thesleff, I. Research Review The Genetic Basis of Tooth Development and Dental Defects. *Am J Med Gen* 2006;140A:2530-2535.

Thesleff I, Nieminen, P: Tooth induction. Encyclopedia of life sciences 2005, John Wiley & Sons Ltd., Chichester <http://www.els.net/> DOI: 10.1038/npg.els.0004183.

Tompkins, K. Molecular mechanisms of cytodifferentiation in mammalian tooth development. Connect Tissue Res 2006;47:111-118.

Tummers, M. & Thesleff, I. Root or crown: a developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species. Development 2003;130:1049-1057.

Tung, K., Fujita, H., Yamashita, Y. & Takagi, Y. Effect of turpentine-induced fever during the enamel formation of rat incisor. Arch Oral Biol 2006;51:464-470.

Vahtokari, A., Åberg, T. and Thesleff, I. Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. Development 1996b;122:121-126.

Warshawsky, H. A light and electron microscopic study of the nearly mature enamel of rat incisors. Anat Rec 1971;169:559-584.

Weerheijm, K.L., Jalevik, B. & Alaluusua, S. Molar-incisor hypomineralisation. Caries Res 2001;35:390-391.